



Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

REC'D 05 FEB 2004

WIPO PCT

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:

Invenzione Industriale

N. RM2002 A 000492



Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

18 NOV. 2003

Roma, 11

IL DIRIGENTE
Paola Giuliano
D.ssa Paola Giuliano

Best Available Copy

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE, DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

NUMERO DOMANDA

REG. A

DATA DI DEPOSITO 01/10/2002

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

RM 2002 A 00 0492

D. TITOLO

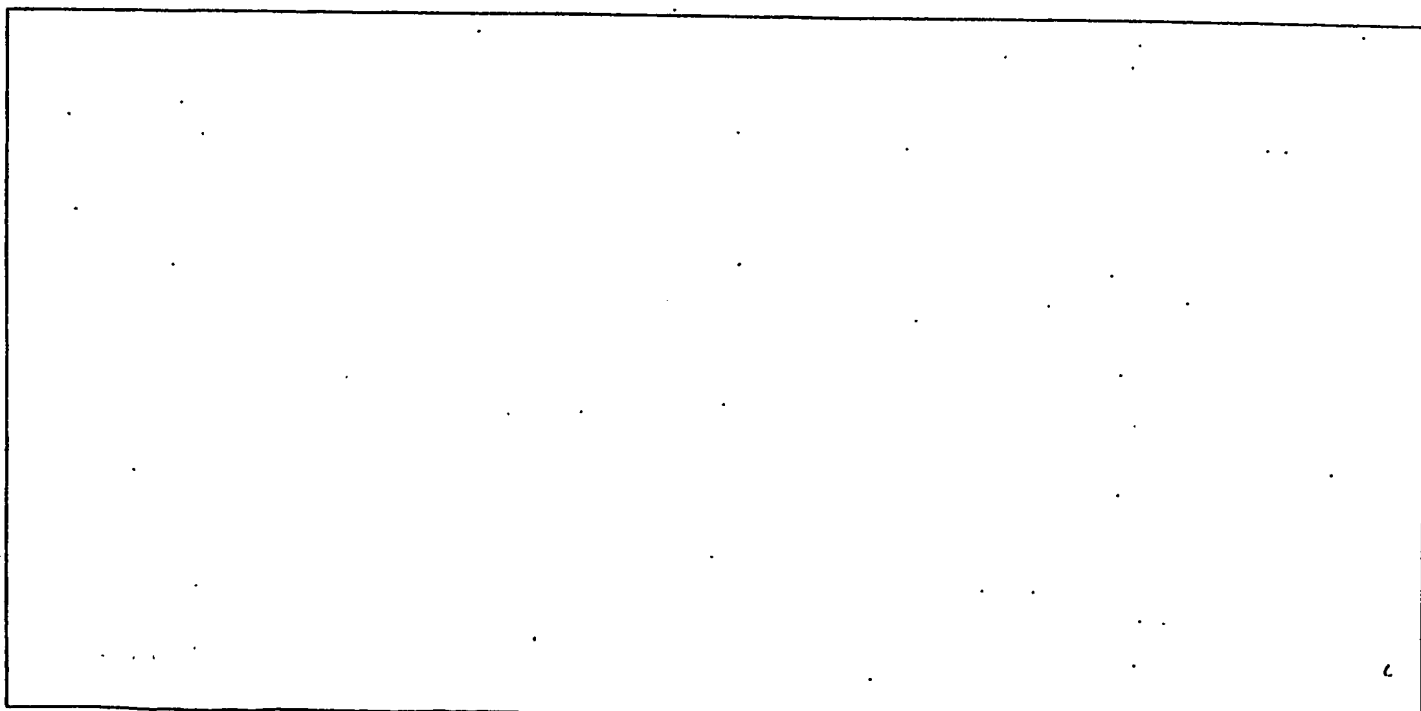
"Uso della propionil L-carnitina per la preparazione di un medicamento per il trattamento del glaucoma"

L. RIASSUNTO

Si descrive l'uso della propionil L-carnitina per la preparazione di un medicamento utile per il trattamento del glaucoma. Tale medicamento preferibilmente adatto alla somministrazione orale od oftalmica. La propionil L-carnitina ha un'azione antiapoptotica nei confronti delle cellule nervose dell'occhio.



M. DISEGNO



RM 2002 A 000492

Descrizione dell'invenzione avente per titolo:

"Uso della propionil L-carnitina per la preparazione di un medicamento per il trattamento del glaucoma"

a nome: SIGMA-TAU Industrie Farmaceutiche Riunite
S.p.A.

di nazionalità: italiana

con sede in: Viale Shakespeare, 47 - 00144 Roma RM

Inventori:

---000---

La presente invenzione si riferisce all'uso della propionil L-carnitina per la preparazione di un medicamento utile per il trattamento del glaucoma.

Sfondo dell'invenzione

Il glaucoma è la seconda causa di cecità nel mondo e può presentarsi in diverse età. Il glaucoma viene classificato in congenito, ad angolo aperto e ad angolo chiuso, in accordo alle cause sottostanti la diminuzione dell'efflusso di umor acqueo. Ogni categoria è poi suddivisa in forme primarie e secondarie (*Coleman A.L., Glaucoma, Lancet 1999; 354: 1803-10*). Queste ultime si presentano comunemente in corso di sindrome da esfoliazione, sindrome da dispersione del pigmento, infiammazione oppure neovascolarizzazione.

L'obiettivo della terapia del glaucoma è quello di prevenire l'ulteriore perdita di visione e di evitare un impatto negativo sulla

qualità della vita del paziente. Le terapie attuali inducono una riduzione della pressione oculare tale da prevenire danni ulteriori a carico del nervo ottico. Infatti, la progressione del danno è determinata dai cambiamenti del nervo ottico o del campo visivo che sono consistenti con la perdita di più cellule gangliari o di assoni.

Le classi di farmaci utilizzati nella terapia del glaucoma sono:

agonisti colinergici ad uso topico (es., pilocarpina, carbacholo), i quali incrementano l'efflusso di umor acqueo; gli effetti collaterali consistono in: incremento di secrezione bronchiale, nausea, vomito, diarrea, incremento della miopia, dolore oculare o del sopracciglio, riduzione della visione, apnea;

antagonisti beta-adrenergici ad uso topico (es., timololo, carteololo, levobunololo, betaxololo), i quali riducono la produzione di umor acqueo; gli effetti collaterali consistono in: scompenso cardiaco congestizio, broncospasmo, bradicardia, depressione, confusione, impotenza, peggioramento della miastenia gravis, incremento ematico del colesterolo;

agonisti adrenergici ad uso topico (es., epinefrina, apraclonidina, brimonidina), i quali riducono sia la resistenza all'efflusso che la produzione di umor acqueo; gli effetti collaterali consistono in: incremento della pressione sanguigna, tachiaritmie, tremori, ansia, dolor di testa, dilatazione della pupilla, reazioni allergiche;

inibitori dell'anidrase carbonica ad uso topico o per via orale (es., dorzolamide e brinzolamide topici; acetazolamide e metazolamide orali), i quali riducono la produzione di umor acqueo; gli effetti collaterali consistono in: malessere, anoressia, depressione, parestesie, anomalie degli elettroliti serici, calcoli renali, discrasie ematiche, reazioni allergiche; alterazioni del gusto (sensazione di gusto amaro o acido);

analoghi delle prostaglandine (es., latanoprost), i quali incrementano l'efflusso di umor acqueo; gli effetti collaterali consistono in aumento di pigmentazione da parte dell'iride e delle ciglia, ipertricosi.

Si comprende da quanto esposto finora che la terapia attuale è principalmente, se non esclusivamente, rivolta al controllo della pressione oculare mediante un'azione sull'umor acqueo, sia per quanto riguarda la sua produzione, sia il suo efflusso.

Nel glaucoma vi è una progressiva degenerazione delle cellule gangliari, legata per alcune di esse all'evento apoptotico (*N. Pescosolido e al. Acta Ophthalmologica Scandinavica, 1988, Supplement 227, 20-21*). La morte cellulare per apoptosi è accompagnata anche da necrosi, per la quale non vi è ancora alcun mezzo per impedirla. Di converso, si può pensare di agire sul fenomeno apoptotico, esercitando di fatto una neuroprotezione (*McKinnon, 1997, Curr. Op. Ophthalmol. 8: 28-37*). Per quanto riguarda il modello di glaucoma basato sul meccanismo dell'apoptosi, si veda il summenzionato lavoro di Pescosolido e al. e la Tesi Sperimentale

di Specializzazione Università degli Studi di Roma "La Sapienza", Istituto di Oftalmologia, di Renata Rosa, Anno Accademico 2000-2001.

Nel brevetto US 5.145.871, a nome della Richiedente, si descrive un trattamento del glaucoma utilizzando acetil D-carnitina, molecola diversa dalla propionil L-carnitina. Nel summenzionato brevetto, la forma di somministrazione preferita è il collirio. L'acetil D-carnitina svolge la sua azione curativa abbassando la pressione intraoculare.

Il brevetto statunitense N° 5.883.127, a nome della Richiedente, descrive l'uso alcanoil L-carnitine, dove il gruppo alcanoil ha da 2 a 6 atomi di carbonio, per la preparazione di un medicamento utile per il trattamento di retinopatie. Tra le diverse retinopatie, sono indicate in particolare la maculopatia dipendente o meno dall'età, la retinopatia diabetica, neuro-retinopatia (malattia di Batten-Mayou, druse dominante ereditaria) degenerazione maculare dipendente dall'età. Le patologie indicate in questo brevetto non hanno alcuna correlazione eziopatogenica con il glaucoma.

È quindi presente la necessità di disporre di un farmaco che agisca sul fenomeno apoptotico delle cellule nervose, preservandole o almeno ritardando la loro morte, quindi la neurodegenerazione oculare. Nel contempo, è anche sentita l'esigenza di disporre di un farmaco che presenti ridotti effetti collaterali.

Riassunto dell'invenzione

È stato ora sorprendentemente trovato che la propionil L-



carnitina esercita un effetto protettivo sulle cellule gangliari del nervo ottico di fatto impedendo o per lo meno ritardando l'apoptosi cellulare. Pertanto, la propionil L-carnitina (di seguito anche PLC) è adatta come principio attivo per la preparazione di un medicamento per il trattamento del glaucoma.

Sulla base dell'insegnamento della tecnica nota, non era prevedibile che la propionil L-carnitina esercitasse un effetto neuroprotettivo, in senso antiapoptotico, sulle cellule del nervo ottico.

La propionil L-carnitina è nota come medicamento per il trattamento di patologie del distretto vascolare ed è in commercio con il marchio DROMOS®. Tra le indicazioni principali, vi la claudicatio intermittens.

Pertanto, è un oggetto della presente invenzione l'uso della propionil L-carnitina o di un suo sale farmaceuticamente accettabile per la preparazione di un medicamento utile per il trattamento del glaucoma.

L'invenzione sarà ora illustrata in dettaglio anche per mezzo di esempi e figure, nelle quali

Figura 1 illustra sezioni istologiche semifine del nervo ottico di ratto normali (Figura 1A), di ratti trattati con MTC (Figura 1B) e di ratti trattati con MTC e propionil L-carnitina (Figura 1C);

Figura 2 illustra sezioni semifine del nervo ottico e retina di ratto trattato con MTC, utilizzando la microscopia a fluorescenza (tecnica TUNEL) per evidenziare cellule apoptotiche, (Figura 2A) e di ratto trattato con MTC e propionil L-carnitina, indicando l'as-

senza di figure apoptotiche (Figura 2B);

Figura 3 illustra lo stato della cromatina nelle cellule prese come campione (Figura 3A) e in cellule trattate con propionil L-carnitina (Figura 3B);

Figura 4 illustra le indagini di citoimmunolocalizzazione sul tipo di morte cellulare cui sono soggette le cellule deprivate del siero (Figura 4A); su cellule 3T6 deprivate del siero e trattate con propionil L-carnitina, (Figura 4B) e l'aspetto morfologico di riferimento (controllo) (Figura 4C).

Descrizione dettagliata dell'invenzione

Per gli scopi della presente invenzione, la propionil L-carnitina o un suo sale farmaceuticamente accettabile sarà convenientemente formulata in una convenzionale composizione farmaceutica.

Tale composizione può essere preparata secondo le normali conoscenze del tecnico del ramo, ad esempio consultando il ben noto "*Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing and Co.*".

Ulteriori esempi di composizioni farmaceutiche si trovano nei brevetti statunitensi N° 6.380.252, 6.346.282, 6.306.392, 6.255.346, tutti a nome della Richiedente o della sua consociata Sigma-Tau HealthScience S.p.A.

Il medicamento secondo la presente invenzione può essere somministrato per via orale, parenterale o topica. La via orale è quella preferita per comodità di uso, ma ad essa si può combinare

anche la forma oftalmica, ad esempio sotto forma di collirio. Una formulazione orale di propionil L-carnitina è nota in commercio con il marchio DROMOS®.

Le dosi e la posologia saranno determinate dal medico curante, secondo la propria esperienza, lo stato della patologia e le condizioni del paziente. A titolo indicativo, una dose di 2 g/die di propionil L-carnitina è preferita. Il farmaco può essere somministrato per os, oppure in altro modo che il medico riterrà opportuno. Vantaggiosamente, tale dose può anche essere raggiunta combinando la somministrazione orale, o per altra via, ad esempio parenterale, con la somministrazione oculare, ad esempio mediante un collirio.

Per sale farmacologicamente accettabile della propionil L-carnitina si intende qualsiasi sale di questa con un acido che non dia origine ad indesiderati effetti tossici o collaterali.

Tali acidi sono ben noti ai farmacologi ed agli esperti di tecnologia farmaceutica.

Esempi non limitativi di tali sali sono ad esempio cloruro, bromuro, orotato, aspartato acido, citrato acido, magnesio citrato, fosfato acido, fumarato e fumarato acido, magnesio fumarato, lattato, maleato e maleato acido, mucato, ossalato acido, pamoato, pamoato acido, solfato acido, glucosio fosfato, tartrato, tartrato acido, magnesio tartrato, 2-ammino etansolfonato, magnesio 2-ammino etansolfonato, colina tartrato e tricloroacetato.

I seguenti esempi illustrano ulteriormente l'invenzione.

ESEMPIO 1

Effetto antiapoptotico *in vivo* della propionil L-carnitina

L'effetto della propionil L-carnitina è stato verificato sul modello sperimentale *in vivo* su ratto. Tale modello di induzione della morte programmata (apoptosi) e/o necrosi cellulare delle cellule gangliari della retina e/o astrociti del nervo ottico è descritto nei summenzionati *Acta Ophthalmologica Scandinavica*, 1988, Supplement 227, 20-21 e Tesi Sperimentale di Specializzazione Università degli Studi di Roma "La Sapienza", Istituto di Oftalmologia. L'ipertono oculare è stato ottenuto mediante iniezioni in camera anteriore di metilcellulosa. I ratti sono stati divisi in tre gruppi: 1) non trattati (bianchi), 2) trattati con metilcellulosa (MTC) 2% (10 microL) e 3) trattati con MTC e propionil L-carnitina 0,15 mM finale iniettata in camera anteriore. In sezioni istologiche semifine del nervo ottico di ratto (colorazione ematossilina eosina) è stata evidenziata la normale organizzazione longitudinale degli astrociti tra le fibre (Figura 1A). Per contro, nei ratti trattati con MTC si evidenziava la perdita dell'organizzazione cellulare e la presenza di astrociti necrotici (Figura 1B). Nel gruppo trattato con MTC e propionil L-carnitina gli astrociti presentavano una organizzazione longitudinale tra le fibre e si notava l'assenza di cellule necrotiche, dimostrando così l'effetto protettivo della propionil L-carnitina (Figura 1C).

In sezioni semifine del nervo ottico e retina di ratto trattato con MTC, utilizzando la microscopia a fluorescenza (tecnica TU-



NEL) per evidenziare cellule apoptotiche, è stata osservata una diffusa colorazione nei diversi strati della retina e nel nervo ottico, indicante la presenza di numerose cellule in apoptosi (Figura 2A). Nel nervo ottico di ratto trattato con MTC e propionil L-carnitina non è stata osservata la presenza di fluorescenza TUNEL, indicando l'assenza di figure apoptotiche (Figura 2B).

Tali risultati mostrano che la propionil L-carnitina protegge il nervo ottico e le cellule retiniche dalla necrosi e dalla apoptosi dipendente dal tono oculare (glaucoma sperimentale).

ESEMPIO 2

Effetto antiapoptotico *in vitro* della propionil L-carnitina

Materiali e metodi

Sono state trattate cellule 3T6 (linea di fibroblasti murini) cresciute in terreno completo (DMEM: 10% NBS, 2% PEST e 2% GLUTAMMINA) con propionil L-carnitina dopo 24 ore dal piastramento delle cellule. Dopo 48 ore dal piastramento (24 ore dalla somministrazione della sostanza), su cellule così trattate è stata eseguita una conta cellulare con colorante eritrosina che evidenzia le cellule non più vitali (diluito 1:5 con tampone PBS A) da cui sono stati ricavati i dati sulla sopravvivenza cellulare. Come controllo sono state utilizzate cellule coltivate in terreno completo su cui la conta è stata effettuata sempre a 24 ore dal piastramento.

In esperimenti successivi, a 24 ore dal piastramento è stata indotta l'apoptosi in cellule 3T6 mediante deprivazione del siero e contemporaneamente è stata fornita a tali cellule la propionil L-

carnitina. Per il composto sono state utilizzate tre diverse concentrazioni: 0,25 mM, 0,55 mM e 1,1 mM. Dopo 48 ore dal piastramento (24 ore dalla somministrazione della sostanza) è stata eseguita una conta cellulare con colorante eritrosina. Come controllo negativo sono state prese cellule cresciute in terreno completo e come controllo positivo cellule deprivate del siero.

Per verificare lo stato della cromatina (e pertanto l'apoptosi) in cellule 3T6 deprivate del siero e in cellule trattate con la propionil L-carnitina, è stata eseguita una reazione TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotinick end labeling) in vitro. Il TUNEL è una tecnica che consiste nell'aggiunta di nucleotidi (coniugati con la fluoresceina) alle estremità 3'-OH libere presenti nel DNA frammentato. Tale reazione è catalizzata dall'enzima terminal trasferasi. La tecnica TUNEL è stata eseguita su cellule deprivate del siero e su cellule deprivate del siero cui sono state somministrate le tre concentrazioni (0,25 mM, 0,55 mM, 1,1 mM) di propionil L-carnitina già utilizzate per le conte cellulari. Come riprova di quanto osservato con la tecnica TUNEL, è stata successivamente eseguita sui campioni una reazione di citoimmunolocalizzazione con un anticorpo primario monoclonale mirato contro BAX (proteina nota in letteratura per essere presente in cellule apoptotiche). Il legame dell'anticorpo primario con il suo epitopo su BAX è stato evidenziato con un anticorpo secondario che sfrutta la colorazione con la DAB (diamminobenzoidina). Le cellule sottoposte a citoimmunolocalizzazione

sono state deprivate del siero dopo 24 ore dal piastramento e trattate con la propionil L-carnitina alle suddette concentrazioni: per il controllo positivo sono state utilizzate cellule coltivate in terreno completo; quello negativo è stato preparato con cellule deprivate del siero a 24 ore dal piastramento.

Risultati

I dati ottenuti dalla conta di cellule coltivate in terreno completo cui è stata fornita propionil L-carnitina, mostrano un incremento della crescita cellulare rispetto a cellule prese come controllo cui non era stato somministrato il composto. Le evidenze sperimentali inducono a ritenere che la propionil L-carnitina è un probabile fattore di crescita o di trofismo cellulare. Le conte cellulari effettuate su cellule deprivate del siero e trattate con il composto hanno dimostrato l'azione protettiva della sostanza in esame nei confronti della deprivazione da siero. In effetti, i risultati ottenuti mostrano una riduzione della mortalità cellulare rispetto ai valori registrati con le cellule deprivate del siero e prese come controllo positivo. Sebbene la vitalità cellulare resti comunque inferiore a quella ricavata dai controlli negativi.

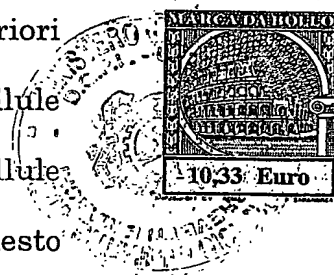
Con la tecnica TUNEL, precedentemente illustrata, si è proceduto a un'indagine sullo stato della cromatina: i dati ottenuti hanno indicato che le cellule deprivate del siero vanno incontro ad apoptosi, fenomeno chiaramente evidenziato in questo caso dalla fluorescenza presente nelle cellule prese come campione (Figura 3A). Al contrario, le cellule trattate con propionil L-carnitina han-

no mostrato un'evidente riduzione della frammentazione cromatinica, riscontrata grazie a una ridotta intensità del fenomeno di fluorescenza (Figura 3B).

Inoltre, le tre concentrazioni saggiate per la sostanza esaminata hanno evidenziato un effetto citoprotettivo sui campioni considerati crescente al crescere delle concentrazioni (0,25 mM, 0,55 mM, 1,1 mM).

Indagini di citoimmunolocalizzazione hanno dato ulteriori indicazioni sul tipo di morte cellulare cui sono soggette le cellule deprivate del siero (Figura 4A). Tali dati mostrano che le cellule deprivate del siero muoiono per apoptosi BAX-dipendente. Questo dato è stato evidenziato dalla localizzazione citoplasmatica di BAX, proteina che prende parte alla cascata di eventi cellulari che portano all'apoptosi. In letteratura è noto che a tale meccanismo apoptotico prendono parte anche la famiglia delle caspasi, proteasi a serina e BCL-2, proteina anti-apoptotica che sembrerebbe agire in modo antagonista rispetto a BAX. L'esperimento di citoimmunolocalizzazione è stato effettuato anche su cellule 3T6 deprivate del siero e trattate con propionil L-carnitina, evidenziando in questo caso una minore espressione di BAX rispetto a quanto osservato nelle cellule deprivate del siero (Figura 4B). In figura 4C è riportato l'aspetto morfologico di riferimento (controllo).

La colorazione così ottenuta, non solo ha fornito un dato qualitativo, evidenziando la presenza o assenza di BAX ma ha al-



tresi fornito un dato quantitativo, permettendo di mettere in luce l'aumento o il decremento dell'espressione della proteina in seguito al trattamento dei campioni con la propionil L-carnitina. Tale espressione si è rivelata essere proporzionale alle diverse concentrazioni della sostanza saggiata.

E' stata inoltre effettuata una controcolorazione con un colorante nucleare, quale l'ematossilina, per avere conferma del fatto che la colorazione ottenuta con la citoimmunolocalizzazione fosse effettivamente citoplasmatica: da quanto riportato in letteratura, è infatti noto che BAX è una proteina a localizzazione citoplasmatica. Inoltre, tale colorazione fornisce informazioni sullo stato di condensazione cromatinica evidenziandone pesanti alterazioni nelle cellule deprivate del siero. Queste alterazioni tendono a ridursi dopo trattamento con la propionil L-carnitina.

Confrontando i dati ottenuti delle conte cellulari, della tecnica TUNEL e della citoimmunolocalizzazione, si può riscontrare un miglioramento della sopravvivenza cellulare dopo trattamento con propionil L-carnitina. Questo risulta evidente sia su cellule cresciute in terreno completo sia su cellule coltivate in condizioni in cui sono indotte all'apoptosi in seguito a deprivazione del siero. Poiché è noto che le cellule gangliari retiniche in seguito a glaucoma vanno incontro a morte per apoptosi, la riduzione di questo fenomeno, dovuto alla propionil L-carnitina, dimostra l'applicazione terapeutica in soggetti glaucomatosi.

ESEMPIO 3

Studio clinico

10 pazienti affetti da glaucoma sono stati trattati con propionil L-carnitina (DROMOS®) per os 2 g/die per un periodo tra i 15 e i 50 giorni. È stato studiato il flusso delle arterie dell'occhio mediante Ecocolordoppler oculare. Sono state esaminate le arterie ciliare posteriore (nasale), ciliare posteriore (temporale), centrale retinica, oftalmica. I flussi sistolici e diastolici sono espressi in cm/s; il rapporto (flusso sistolico – flusso diastolico)/flusso sistolico esprime l'indice di resistenza periferica. Sono stati confrontati i campi visivi prima e dopo il trattamento con DROMOS®.

I pazienti affetti da glaucoma mostrano una riduzione dei flussi arteriosi, nei diversi vasi, con evidente incremento delle resistenze periferiche oculari e tale quadro, se protratto, conduce a danni del nervo ottico.

Il trattamento con DROMOS® incrementa i flussi e riduce l'indice di resistenza nei settori colpiti. La pressione endoculare non è interessata dal trattamento, infatti non si hanno riduzioni significative delle pressioni oculari.

A titolo esemplificativo, sono riportati due casi:

Paziente 1

Età: 80 anni

Maschio

Pressione endoculare <18

Diagnosi: glaucoma, durata del trattamento: 30 giorni

Campo visivo (Octopus) esperto prima: OS MS 11,6; MD 2;

Campo visivo (Octopus) dopo: OS MS 20,2; MD 5,6;

Ecocolordoppler oculare:

Prima del trattamento:

Arteria ciliare posteriore nasale SN 5,96/2,21 (I.R. 0,63)

flusso sistolico/flussi diastolico cm/s.

Dopo il trattamento:

Arteria ciliare posteriore nasale SN 16,7/5,75 (I.R. 0,66).

Paziente 2

Età: 66 anni

Femmina

Pressione endoculare <18

Diagnosi: glaucoma angolo aperto (GPAA), durata del
trattamento: 12 giorni

Campo visivo (Octopus) esperto prima: OD MS 15,5; MD
11,1

Campo visivo (Octopus) esperto dopo: OD MS 18,2; MD 8,4;

Ecocolordoppler oculare:

Prima del trattamento:

Arteria ciliare posteriore temporale SN 5,75/1,92 (I.R. 0,67);

Dopo il trattamento:

Arteria ciliare posteriore temporale DX 8,65/3,86 (I.R. 0,55).

I risultati dimostrano che la propionil L-carnitina, nella
dose preferita di 2 g al giorno per os migliora i flussi dei vasi
oculari, migliorando anche i campi visivi in soggetti con glaucoma

stabilizzato. La propionil L-carnitina esercita la sua azione terapeutica proteggendo la perfusione del nervo ottico e delle strutture retiniche.

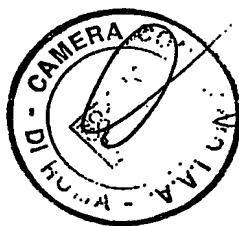


18
RM 2002 A 000492

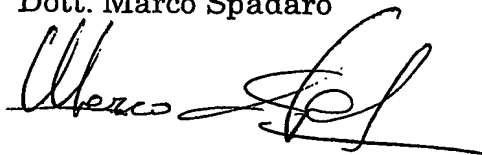
RIVENDICAZIONI

1. Uso di propionil L-carnitina o di un suo sale farmaceuticamente accettabile per la preparazione di un medicamento utile per il trattamento del glaucoma.
2. Uso secondo la rivendicazione 1, dove detto medicamento è somministrato per via orale, parenterale od oftalmica.
3. Uso secondo la rivendicazione 2, dove detto medicamento è somministrato in forma combinata per via orale e oftalmica.
4. Uso secondo una delle rivendicazioni precedenti, dove detto medicamento è adatto alla somministrazione di 2 g al giorno di propionil L-carnitina.
5. Uso secondo una delle rivendicazioni precedenti, dove detto sale di propionil L-carnitina è scelto tra cloruro, bromuro, orotato, aspartato acido, citrato acido, magnesio citrato, fosfato acido, fumarato e fumarato acido, magnesio fumarato, lattato, maleato e maleato acido, mucato, ossalato acido, pamoato; pamoato acido, solfato acido, glucosio fosfato, tartrato, tartrato acido, magnesio tartrato, 2-ammino etansolfonato, magnesio 2-ammino etansolfonato, colina tartrato e tricloroacetato.

p.i. di SIGMA-TAU Industrie Farmaceutiche Riunite S.p.A.



Dott. Marco Spadaro



RM 2002 A 000492



A

Astrocita

Controllo



B

Astrocita

MTC

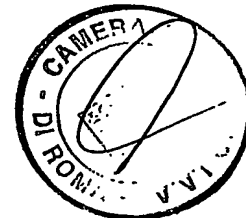


C

Astrocita

MTC +

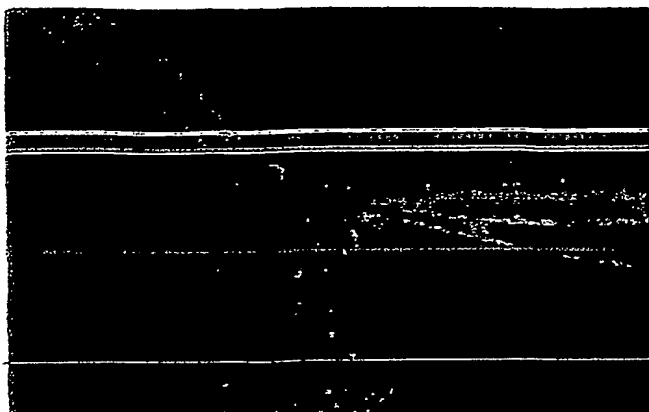
Dromos



p.i. Sigma-Tax Industrie Farmaceutiche
Riunite S.p.A.

Dott. Marco Spadaro

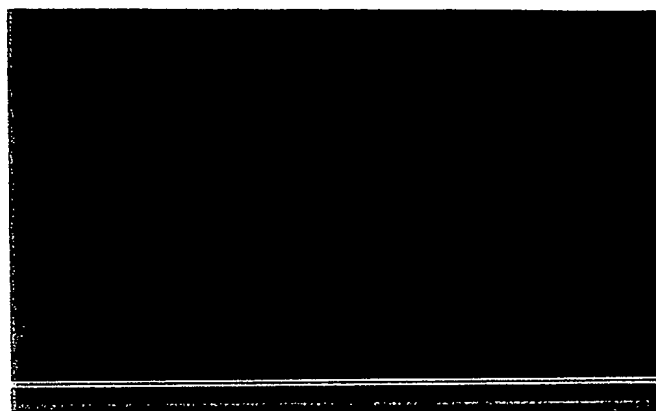
Fig. 1



A

Tunel MTC

RM 2002 A 000492¹



B

**Tunel
Dromos 0.15 mM**



C

Dromos 0.15 mM

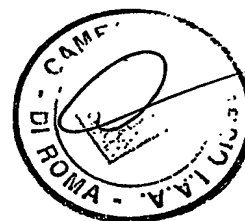
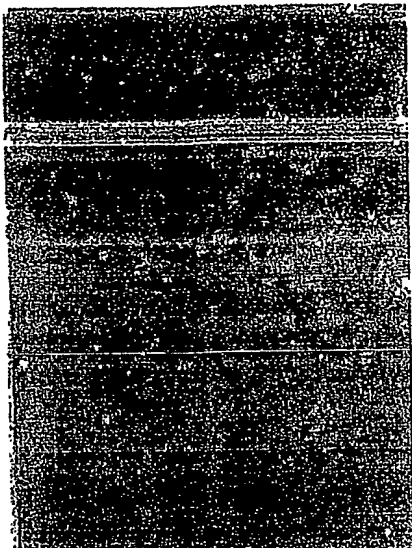


Fig. 2

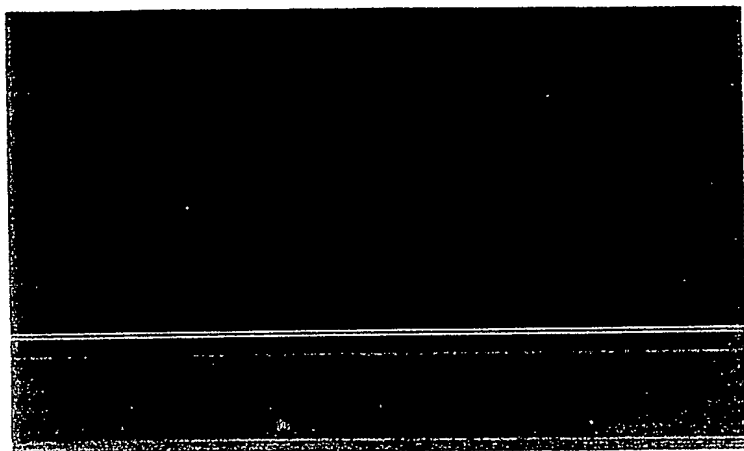
Spadaro



A

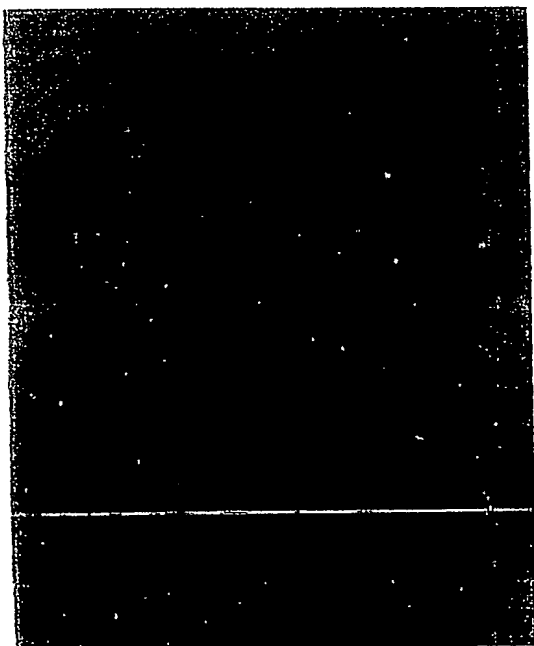
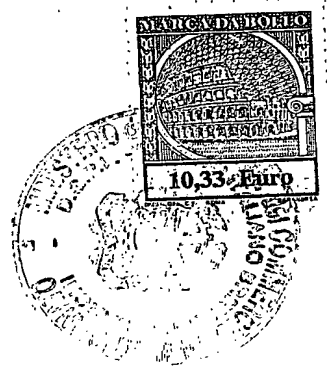
Tunel starvate

RM 2002 A 000492



B

**Tunel starvate +
Dromos 0.25 mM**



C

**Tunel Starvate +
Nicetile 0.25 mM**

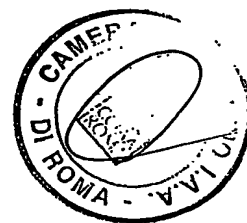
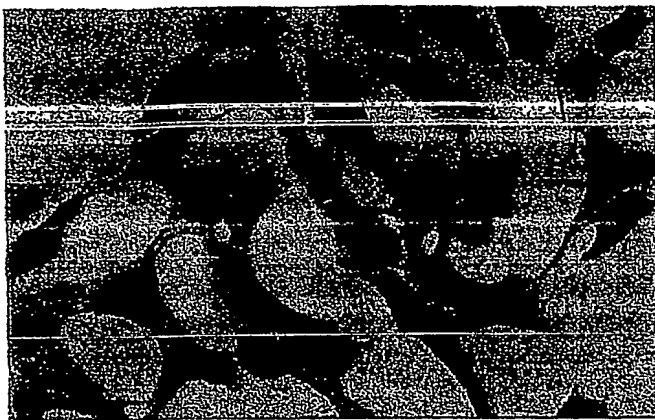


Fig. 3

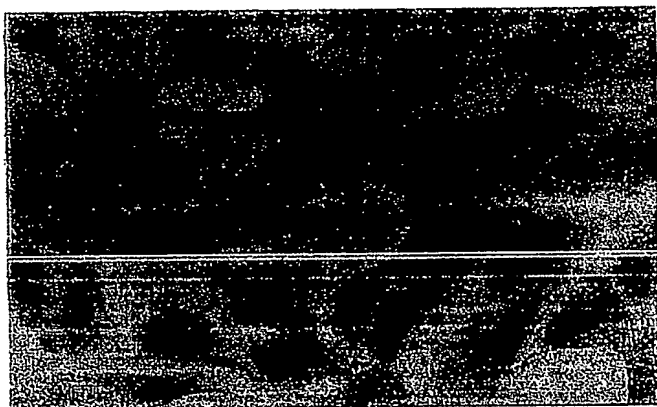


A

Cellule 3T6 Starvate

α -Bax

RM 2002 A 000492

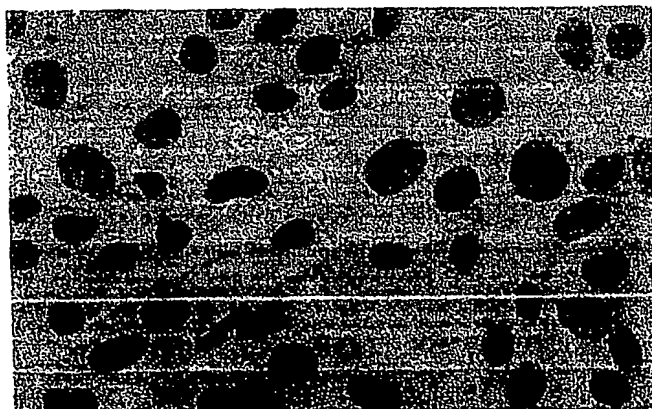


B

Cellule 3T6

Starvate + Dromos 0.25 mM

α -Bax



C

Controllo 3T6

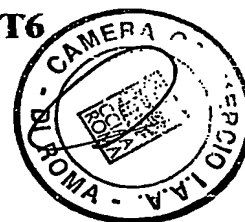


Fig. 4

α -Bax

Handwritten signature

**p.i. Sigma-Tau Industrie Farmaceutiche Riunite S.p.A.
Dott. Marco Spadaro**

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ ~~FADED~~ TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.